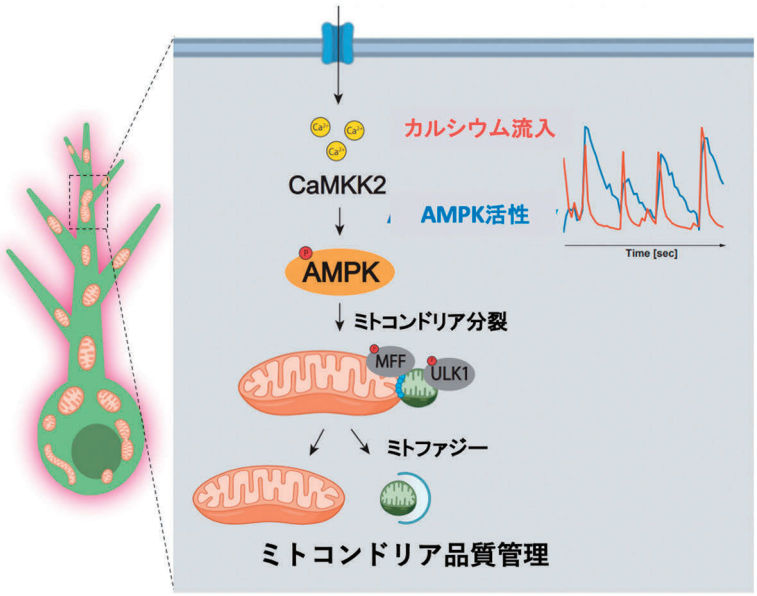
29　樹状突起ミトコンドリアの神経活動依存的品質管理機構	見學　美根子

【目的】ニューロンは神経活動に伴う間断ないイオン能動輸送のため多くの ATP エネルギーを要する。特に未成熟なニューロンは、急速な突起伸長に伴う細胞骨格再編成と細胞内輸送に莫大な ATP エネルギーを必要とし、ミトコンドリアを盛んに生合成して突起全長へ運搬することが明らかになっている。近年ミトコンドリア分裂・融合および共役する品質管理、生合成の細胞分子機構は急速に解明されているが、ニューロンのような活動状態が時空間的に激しく変動する細胞において、ミトコンドリアダイナミクスの平衡が如何に動的に制御されるかは明らかでない。本研究では、海馬錐体ニューロンの神経活動依存的な樹状突起発達において、ミトコンドリア分裂・融合の時空間ダイナミクスとその制御機構を明らかにすることを目標とした。

【方法】1. ライブ観察：マウス胎児から採取した海馬ニューロンを初代培養し、pAAV-CAG-mitoDsRed を導入してミトコンドリア動態を、スピニングディスク共焦点顕微鏡 CV1000 を用いて観察した。AMPK 活性は AMPKAR-EV および jRGECO1a を導入したニューロンを用いて蛍光顕微鏡 IX83 で 5 秒間隔 5 分間解析した。TMRM 計測は、mito-GFP を導入した培養ニューロンを 20 nM TMRM で 1〜2 時間処理したのち CV1000 を用いて 5 秒間隔 10 分間行った。活性酸素発生は、mito-SOX を導入したニューロンを CV1000 で観察して定量評価した。2. 免疫染色：培養ニューロンを 4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.25%TritonX-100/PBS で透過処理した。一次抗体と二次抗体で反応後、レーザー共焦点顕微鏡 FV1000 で観察した。

【結果】培養下でシナプス形成前の未熟な海馬ニューロンの自発発火を抑制し、成長を遅延させた樹状突起では、ミトコンドリア分裂が阻害され長大化していた。この時期に活性が上昇する AMPK を shRNA ノックダウンすると、神経活動の抑制と同様に樹状突起成長が遅延し、ミトコンドリア分裂が阻害され長大化した。AMPK 活性を FRET プローブでライブ観察すると、カルシウムスパイクと同期して振動しており、カルシウム依存性 CaMKK2 の制御を受けることが明らかになった。さらに神経活動は AMPK を介してミトコンドリア分裂制御因子 MFF とオートファジー制御因子 ULK1 を活性化することが明らかになった。*AMPK* 欠損下では樹状突起ミトコンドリア呼吸が低下する兆候が認められた。以上の結果より、神経活動が CaMKK2-AMPK 経路を活性化し、樹状突起成長に必要なミトコンドリア品質管理を制御することが明らかになった。

発達中の樹状突起における神経活動によるミトコンドリア品質管理の分子経路



29. 樹状突起ミトコンドリアの神経活動依存的品質管理機構

見學　美根子

京都大学 高等研究院 物質-細胞統合システム拠点

Key words：樹状突起，ミトコンドリア，AMPK，ミトファジー，神経発生

緒　言

中枢神経系ニューロンの樹状突起発達は神経活動により促進することが知られており、個体の環境に適応的な神経回路形成を可能にする細胞機構の一つと考えられている。多くの研究により、カルシウム／カルモジュリン依存的な転写制御と細胞骨格再編成が樹状突起形成を促進することが示されてきた［1，2］。

急速な樹状突起の発達は細胞骨格の再編成と細胞内輸送の拡張などに大量のエネルギーを要するため、ミトコンドリアを盛んに生合成して突起全長へ運搬することが我々を含む先行研究で明らかになっている［3，4］。ミトコンドリアは分裂により数を増やしたり損傷部分を削除したりする一方、融合により内部環境の安定化を図る。近年ミトコンドリア分裂・融合および共役する品質管理、生合成の細胞分子機構は急速に解明されているが、細胞または細胞構造の局所の状態に適応的にミトコンドリアダイナミクスが制御される機構は不明である。特にニューロンのような活動状態が時空間的に激しく変動する細胞において、ミトコンドリアダイナミクスの平衡が如何に動的に制御されるかは明らかでない。

AMP-activated kinase（AMPK）は代謝制御のマスター分子とも言われ、エネルギー枯渇下で多くの代謝経路の調節を行う。そのエフェクター分子にはミトコンドリアの分裂、生合成、オートファジー経路の重要分子が含まれており、ミトコンドリアホメオスタシスの調節に重要な役割を担う［5］。AMPK はエネルギー枯渇下で AMP のアロステリック結合で活性化する他、カルシウム感受性 CaMKK2 により直接リン酸化を受けることも示されている［6］。AMPK はアルツハイマー脳でカルシウム恒常性が破綻したニューロンにおいて過剰活性化し、ミトコンドリアの機能不全のトリガーとなることが最近の研究で明らかにされている［7］。しかし、発生期のニューロンにおける機能には不明の点が多い。

本研究では、神経活動依存的な樹状突起成長におけるミトコンドリア動態の制御機構を明らかにすることを目指した。その結果、神経活動が CaMKK2-AMPK 経路の活性化を介して樹状突起成長に必要なミトコンドリア品質管理を制御することが明らかになった［8］。

方　法

1. 海馬ニューロンの培養および遺伝子導入

生後 0 日のマウス海馬を採取し、解離後 poly-D-lysine を塗布したカバーガラス上に播種して 2% B-27/Neurobasal で培養した。3 日後にリポフェクション法でプラスミドを導入し、AraC を付加して様々な処理を加え、合計 5 日間培養後解析を行った。

2. ライブ観察とイメージ解析

ミトコンドリア動態は、pCAG-EGFP および pAAV-CAG-mitoDsRed を導入したニューロンを、横河電機製スピニングディスク共焦点顕微鏡 CV1000 を用いて 3 秒間隔 20 分間観察した。AMPK FRET は AMPKAR-EV および jRGECO1a を導入したニューロンを用いてオリンパス製蛍光顕微鏡 IX83 で 5 秒間隔 5 分間解析した。TMRM 計測

は、mito-GFP を導入した培養ニューロンを 20 nM TMRM で 1〜2 時間処理したのち CV1000 を用いて 5 秒間隔 10 分間行った。活性酸素発生は、mito-SOX を導入したニューロンを CV1000 で観察して定量評価した。

3. 免疫蛍光法と画像取得

子宮内電気穿孔法で遺伝子導入した個体は、生後 5 日または 10 日で麻酔後、4%パラホルムアルデヒドで灌流固定し、2 時間の後固定ののちアガロース包埋し、200 μm の凍結切片を作製した。培養ニューロンは 4%パラホルムアルデヒドで固定後、0.25%TritonX-100/PBS で透過処理した。一次抗体と二次抗体で反応後、オリンパス製レーザー共焦点顕微鏡 FV1000 で観察した。

結　果

1. 未熟ニューロンの自発的神経活動の阻害は樹状突起ミトコンドリアの分裂を阻害する

海馬ニューロンの初代培養にカルシウム蛍光プローブ GCaMP6s を導入してライブ観察を行うと、シナプス形成以前の培養 3 日目には自発発火が見られ、TTX と APV 処理で消失することを確認した。培養 3 日目から TTX+APV 処理したニューロンと対照群の樹状突起形成をライブ観察で比較すると、5 日目には処理群で有意な遅延が生じており、すでに報告のある神経活動依存的な樹状突起伸長が再構成できることを確認した［1, 2］。

次に神経活動によりミトコンドリア動態に変化があるかを観察した。mito-DsRed 標識したミトコンドリアを固定したニューロンで観察すると、神経活動を阻害して成長遅延した樹状突起において有意に長大化していることが分かった［中央値（IQR）：対照群 2.0（1.2〜2.9）μm vs 処理群 2.5（1.6〜3.9）μm］。さらにライブ観察でミトコンドリア動態を解析したところ、ミトコンドリア分裂が有意に抑制されていた。分裂のうち、生合成を誘導するとされる中間帯分裂（midzone fission）よりミトファジーを誘導するとされる辺縁帯分裂（peripheral fission）がより強く抑制されていた。ミトコンドリア融合には有意な変化は見られなかった（図 1）。以上の結果から、神経活動は発達中の樹状突起でミトコンドリアの辺縁帯分裂を促進することが示唆された。

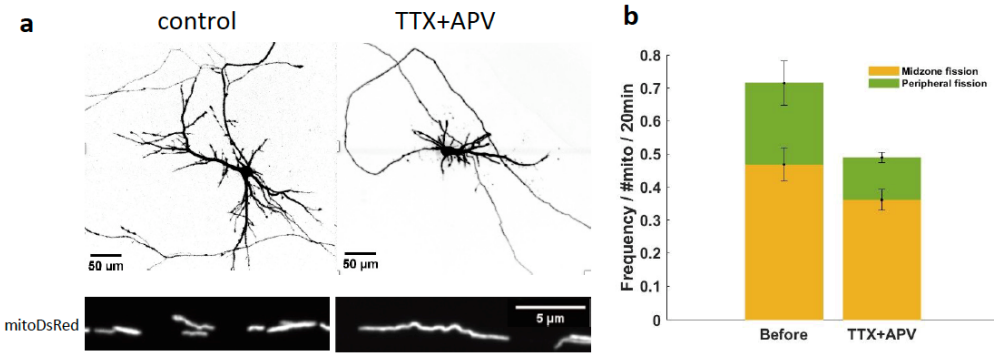


図 1. 自発活動の抑制により樹状突起ミトコンドリア分裂が阻害される

a）培養 3〜5 日に TTX と APV 処理した海馬ニューロンは樹状突起成長が抑制され（上）、ミトコンドリアが長大化する（下）。

b）活動抑制前後でのニューロン樹状突起におけるミトコンドリア分裂。値は mean± SEM（N＝14 細胞）。*p＝0.0491 for midzone fission、**p＝0.0038 for peripheral fission（両側検定）。

2. AMPK は神経活動で活性化し樹状突起ミトコンドリアの分裂を誘導する

神経活動に依存したミトコンドリア分裂の制御因子として AMPK に着目した。ウェスタンブロットで解析すると、AMPK は分化中のニューロンに発現し、樹状突起発達期にリン酸化が亢進していた。またニューロンをグルタミン酸

処理して神経活動を亢進させるとリン酸化が促進し、TTX＋APV 処理した群では有意に減弱していた。そこで分化中のニューロンに強く発現する AMPKα2 サブユニットの shRNA ノックダウンを行ったところ、神経活動阻害と同様に樹状突起成長が顕著に遅延し、ミトコンドリアが有意に長大化していた。さらにライブ観察を行うと、ミトコンドリア融合は変化せず、分裂が抑制され、特に辺縁帯分裂が強く抑制されていた。これらの変化は全て神経活動阻害で見られたものと一致しており、AMPK が神経活動依存的なミトコンドリア動態制御を媒介していることが示唆された。

3. AMPK 活性は神経活動によるカルシウム動態と同期して振動する

ニューロンにおける AMPK 活性を FRET プローブで観察すると、樹状突起と細胞体において断続的な揺らぎがあることが分かった。そこで神経活動に伴うカルシウム流入と同時観察したところ、AMPK 活性の揺らぎはカルシウム振動と同期しており、TTX＋APV でカルシウム振動を阻害すると AMPK の活性化も消失した。逆にニューロンをグルタミン酸処理すると大きなカルシウム流入と共に AMPK 活性も増大することから、AMPK 活性が神経活動によるカルシウム流入に依存して振動することが示唆された。AMPK は ATP 枯渇のほか、LKB1 または CaMKK2 に直接リン酸化されることが知られている。ニューロンにおける AMPK 振動は、LKB1 阻害では変化がなかったが、CaMKK2 の shRNA ノックダウンまたは薬理阻害で顕著に減弱したことから、CaMKK2 に制御されることが示された。以上の結果より、ニューロンにおいて神経活動がカルシウム-CaMKK2 経路を介して AMPK の活性化を動的に制御することが明らかになった。

4. AMPK は海馬ニューロンのミトコンドリア分裂とミトファジーを制御する

AMPK 基質のうち、ミトコンドリアホメオスタシスに関与する分子の活性を調べたところ、ミトコンドリア分裂制御分子 MFF のリン酸化が、グルタミン酸処理または AMPK 活性化剤 AICAR 処理で亢進し、TTX＋APV 処理または AMPK 阻害剤処理で抑制された。またミトファジー制御分子 ULK1 のリン酸化も同様に推移した。一方ミトコンドリア生合成制御因子 PKCb1 の活性には変化がなかった。次に AMPK ノックダウンしたニューロン樹状突起におけるミトファジーを定量した。野生型ニューロンの樹状突起には、オートファジーマーカーの p62 の集積が点在し、その一部がミトコンドリア端に局在しており、一定のミトファジーが起こっていることが示唆された。一方 *AMPK* 欠損ニューロンでは、p62 の集積が有意に減少し、ミトコンドリアへの局在も著しく低下していた（図 2）。以上の結果から、AMPK はミトコンドリア辺縁帯分裂とそれに続くミトファジーを制御していることが強く示唆された。

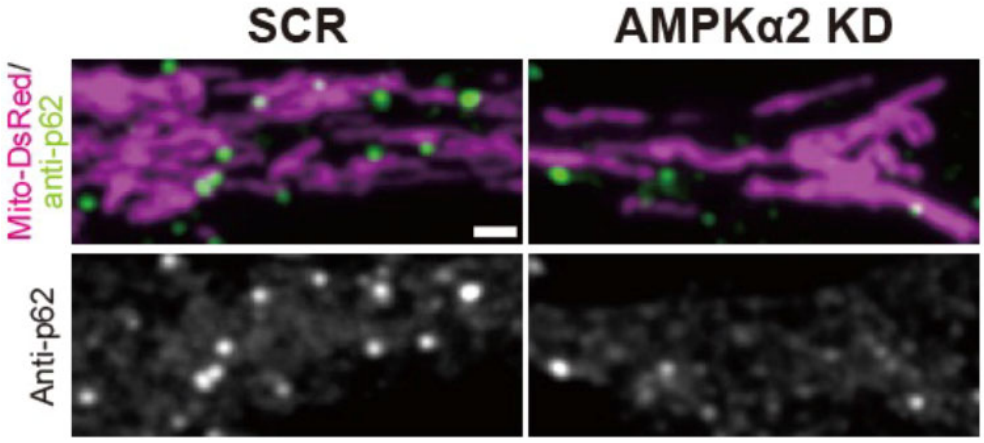


図 2. *AMPK* 欠損により長大化したミトコンドリアではミトファジーが抑制される
MitoDsRed と共に AMPK shRNA またはスクランブル shRNA を導入した海馬ニューロンを培養 5 日目に固定し、p62 抗体で免疫染色を行った。対照群では樹状突起ミトコンドリア（マゼンタ）に p62 塊（緑）が多く共局在するのに対し、AMPK ノックダウンでは p62 塊が減り、共局在も減少する。スケールバー：1μm。

5. AMPK によるミトコンドリア分裂とミトファジーはミトコンドリア品質管理に寄与する

最後に、AMPK 阻害下で分裂とミトファジーを抑制されたミトコンドリアの活性状態を調べた。正常な膜電位をもつ活動性のミトコンドリアマーカーである TMRM で標識すると、野生型ニューロンに比べ *AMPK* 欠損ニューロンでは僅かながら有意な減弱が見られた。さらに野生型で散見される酸素呼吸に伴う活性変動が、*AMPK* 欠損ニューロンでは殆ど起こらなかった。次にミトコンドリア呼吸の指標として mitoSOX 染色を行い、電子伝達系副産物である活性酸素の発生を観察した。野生型ニューロンでは樹状突起ミトコンドリアマトリクスに mitoSOX のシグナルが点在していたが、*AMPK* 欠損ニューロンではその数が大幅に減少していた。これらの結果から、*AMPK* 欠損下でミトファジーを抑制されたミトコンドリアは正常より活性が低いことが示唆された。

考　察

本研究により、海馬ニューロンの活動依存的な樹状突起成長において、AMPK によるミトコンドリアホメオスタシス制御が関与することが示された。AMPK は神経活動によるカルシウム流入で活性化する CaMKK2 にリン酸化されて活性化し、MFF や ULK1 などのエフェクター分子のリン酸化によりミトコンドリア分裂と共役するミトファジーを誘導することが明らかになった。*AMPK* 欠損下でミトコンドリア は長大化し、ミトファジーによる品質管理を受けないために機能低下しており、樹状突起成長に必要な ATP 産生能が減少していることが示唆された。

興味深いことに、AMPK 活性はカルシウム振動と同期して動的に揺らいでおり、ニューロンの活動状態により活性が微調節されることが示唆された。ミトコンドリアの低形成や機能低下は ATP 枯渇を、過活動は酸化ストレスの増大による細胞障害を招くため、細胞分化・活動状態に応じて過不足なく供給される必要があり、AMPK 活性の動的制御はミトコンドリアホメオスタシスの厳密な制御に有効であると考えられる。AMPK 活性の動的制御の詳細な分子機構及び多くの下流経路の選択との関係を解明するのは、今後の課題である。

文　献

1) Konur S, Ghosh A. Calcium signaling and the control of dendritic development. Neuron.2005 May 5;46(3):401-5. PMID: 15882639 DOI: 10.1016/j.neuron.2005.04.022
2) Andreae LC, Burrone J. Spontaneous Neurotransmitter Release Shapes Dendritic Arbors via Long-Range Activation of NMDA Spontaneous Neurotransmitter Release Shapes Dendritic Arbors via Long-Range Activation of NMDA Receptors. Cell Rep. 2015 Feb 17;10(6):873-882. Epub 2015 Feb 13. PMID: 25683710 DOI: 10.1016/j.celrep.2015.01.032
3) Fukumitsu K, Fujishima K, Yoshimura A, Wu YK, Heuser J, Kengaku M. Synergistic Action of Dendritic Mitochondria and Creatine Kinase Maintains ATP Homeostasis and Actin Dynamics in Growing Neuronal Dendrites. J Neurosci. 2015 Apr 8;35(14):5707-23. PMID: 25855183 DOI: 10.1523/JNEUROSCI.4115-14.2015
4) Sheng ZH, Cai Q. Mitochondrial transport in neurons: Impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. Nat Rev Neurosci. 1012 Jan 5;13(2), 77-93. PMID: 22218207 DOI: 10.1038/nrn3156
5) Herzig S, Shaw RJ. AMPK: Guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. Nat Rev Mol Cell Biol. 2018 Feb;19(2):121-135. Epub 2017 Oct 4. PMID: 28974774 DOI: 10.1038/nrm.2017.95
6) Mairet-Coello G, Courchet J, Pieraut S, Couchet V, Maximov A, Polleux F. The CAMKK2-AMPK Kinase Pathway Mediates the Synaptotoxic Effects of Aβ Oligomers through Tau Phosphorylation. Neuron. 2013 Apr 10;78(1):94-108. PMID: 23583109 DOI: 10.1016/j.neuron.2013.02.003

7) Lee A, Kondapalli C, Virga DM, Lewis TL Jr, Koo SY, Ashok A, Mairet-Coello G, Herzig S, Foretz M, Viollet B, Shaw R, Sproul A, Polleux F. Aβ42 oligomers trigger synaptic loss through CAMKK2-AMPK-dependent effectors coordinating mitochondrial fission and mitophagy. Nat Commun. 2022 Aug 1;13(1):4444. PMID: 35915085 DOI: 10.1038/s41467-022-32130-5

8) Hatsuda A, Kurisu J, Fujishima K, Kawaguchi A, Ohno N, Kengaku M. Calcium signals tune AMPK activity and mitochondrial homeostasis in dendrites of developing neurons. Development. 2023 Oct 12:dev.201930. PMID: 37823352 DOI: 10.1242/dev.201930